



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 57272

(13) A

(51) 7 G01N33/49

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ РАНЬОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ЛЮДИНИ

1

2

(21) 2002065207

(22) 25 08 2002

(24) 16 06 2003

(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р.

(72) Приходченко Анатолій Андрійович, Коваленко
Алла Леонідівна(73) ДНІПРОДЗЕРЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ(57) Спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин
людини шляхом визначення клітинних маркерів,

який відрізняється тим, що в мазку лейкоконцентрату венозної крові визначають відсотковий вміст клітинних форм гранулоцитарного, лімфоїдного, моноцитарного, плазмочитарного, еритроїдного відростків і при наявності більш 5% бластних клітин і більш 2% нетипових малігнізованих форм діагностують наявність злоякісного процесу в організмі

Винахід відноситься до медицини, а саме до онкології і може бути використаний для діагностики злоякісних пухлин людини

Нормальний вміст клітин у венозній крові людини добре вивчено і подано в літературі (Поспелова Р.А. Лейкоконцентрація в клінічній практиці М. Медицина -1973 -22 с)

По Р.А. Поспеловій кількісний та якісний параметри венозної крові людини практично не відрізняються від даних периферійної крові. Це положення потребує уточнення у зв'язку з екологічною ситуацією, що складається в урбанізованих регіонах нашої держави

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб діагностування злоякісних пухлин людини (А.С. СРСР № 1432008, МКИ С01N 33/09, БІН 39, 1968), який міститься в тому, що в мазку визначають відсотковий вміст малих лімфоцитів (діаметр 7,5 мкм) і при його зниженні до 15% та нижче і при наявності сенсифікації лімфоцитів діагностують злоякісну пухлину в організмі

Відомий спосіб орієнтований на визначення вмісту лімфоцитів у капілярній крові, взятої з пальця (не венозної крові), що суттєво знижує діагностичну цінність, так як кількісні характеристики периферійної крові (капілярної) достатньо лабільні, схильні до суттєвих коливань, а міграція великих клітин та клітинних елементів, володіючих підвищеною адгезивністю, із венозного русла до

капілярів ускладнена

Малі лімфоцити та "голі ядра" являють собою достатньо мобільну клітинну популяцію, яка деформує свої параметри внаслідок чисельності екстремальних ситуацій та має свої біоритмічні флуктуації. Зниження кількості малих лімфоцитів є неспецифічним процесом і не може відображати тільки наявність злоякісного процесу

Використання в реакції продавлення проминання лейкоцитів нестандартних водно-солених екстрактів алогенних пухлин робить цей тест нестандартним, знижує обґрунтованість судження про наявність пухлини в організмі хворого

В основу винаходу поставлена задача удосконалення способу діагностики злоякісних пухлин в організмі дослідом лейкограми лейкоконцентрату венозної крові шляхом оцінки тонких морфологічних критеріїв та нових типів клітин, відображаючи структуру та функцію практично усіх ростків кровотворення, що дозволяє визначити ранні ознаки патології і здійснити ранню діагностику злоякісних процесів

Поставлена задача вирішується тим, що в способі діагностики злоякісних пухлин людини шляхом клітинних маркерів, згідно винаходу, в мазку венозної крові визначають відсотковий вміст клітинних форм гранулоцитарного, лімфоїдного, моноцитарного, плазмочитарного, еритроїдного паростків кровотворення і при наявності більш ніж

(13) A
(11) 57272
(19) UA

5% бластних клітин та більш 2% нетипових малігнізованих форм діагностують зпоякісну пухлину в організмі

Висока інформативність методу забезпечується в значній мірі збагаченням препарату ядерними клітинами, звичайно не представленими у мазках крові, взятій з пальця. В одному полі зору під великим збільшенням можна спостерігати від 30 до 70 ядерних елементів крові. Це дає можливість оцінити функцію системи кровотворення, імунітету шляхом вивчення морфологічних маркерів, та виявляємо загальноприйнятими методами

В умовно здорових людей лейкограма лейкоконцентрату венозної крові (ЛВК) виглядає спідуючим чином (див таб 1)

Таблиця 1

Контрольні показники лейкограми лейкоконцентрату венозної крові умовно здорової людини

№ п/п	Найменування показника	Показник (відсотковий) або знак
1	Недиференцовані бласті	до 0,1
2	Лімфобласті	до 0,1
3	Мієлобласті типичні	до 0,1
4	Мієлобласті атипичні	0
5	Плазмобласті	0
6	Єритробласті	0
7	Мегалобласті	0
8	Ретикуломегалобласті	0
9	Нормобласті поліхроматофільні	0,2
10	Нормобласті оксіфільні	0,2
11	Нормобласті базофільні	0,2
12	Монобласті	до 0,2
13	Мікролімфоцити	0
14	Малі лімфоцити	5,0-10,0
15	Середні лімфоцити	15,0-20,0
16	Гіпербазофільні лімоцити	до 1,0
17	Промієлоцити	0
18	Мієлоцити	до 0,1
19	Метамієлоцити	до 0,2
20	Палочкоядерні нейтрофілоцити	до 0,5
21	Сегментоядерні нейтрофілоцити	40,0-60,0
22	Еозинофіли	0,1-1,0
23	Базофіли	0,1-0,5
24	Моноцити	5,0-8,0
25	Анізоцитоз	(-) до (+)
26	Анізохромія	(-) До (+)
27	Малігнізовані клітини	0

Сутність методу полягає в концентруванні клітин, які містять ядро, венозної крові людини з наступним мікроскопуванням сухих фіксованих і пофарблених мазків лейкоконцентрату, вивченням морфології клітин і диференційованим підрахунком їх процентного співвідношення

Спосіб здійснюють спідуючим чином

В стерильну пробірку беруть кров з ліктьової вени в кількості 20см² у пробірку з гепарином фірми "Біохемі" (Австрія) із розрахунку 25 М Е на 1мл

суцільної крові. Далі кров відстоюють при кімнатній температурі протягом 1 години. При цьому еритроцити осаджуються і над ними формується супернатант, який містить ядерні клітини. Супернатант відсмоктують і центрифугують при відносному прискоренні 1000 - 1500G протягом 10хв

Осадок ресуспензують і готують препарат за принципом виготовлення мазка периферійної крові

Мазки витримують у метиловому спирті не менше 15хв, або етиловому спирті не менше 5хв. Потім мазки висушують на повітрі

Приготовані фіксовані мазки розміщують в штатив-контейнер, який опускають в кювету з робочим розчином барвника та витримують в ньому суворо визначений час, підібраний для кожної партії фарби Романовського - Гімза. Звичайний час фарбування від 35 до 45хв. Потім штатив переносять в кювету з водопровідною водою, після промивки мазки ставлять вертикально в штатив для суміння

Далі проводять мікроскопічний дослід. Підрахунок лейкоцитів ведуть під великим збільшенням /х 1000/ по лінії Меандера, тобто відступивши 2 - 3 поля зору і потім по зигзагу. Проводять підрахунок не менше 300 клітин, враховуючи поруйновані клітини

При аналізі ЛВК людини найбільш інформативним критерієм є появлення в венозній крові клітинних елементів - нетипових та бластних не властивих морфологічному якісній зміні морфології клітини венозної крові. Особливий увазі підлягає сполучення цих двох

компонентів реєстрація нехарактерних для периферійної крові клітинних елементів та клітин зі зміненою морфологією

Приклад 1

Хвора Ш Н П 84-х років. Звернулася до лікаря-гематолога зі скаргами на пухлину видне утворення у правій молочній залозі. Дані ЛВК подані в таблиці 2

Таблиця 2

Лейкограма ЛВК хворої Ш Н П

Номенклатура клітини ЛВК	Відсоток
1	2
Мікролімфоцити	1,49
Середні лімфоцити	7,86
Лімфоцити з ядерними конволутами	1,49
Веретеноподібні мононуклеари	2,98
Важко що диференціюються мононуклеари	0,37
Промієлоцити	0,74
Мієлоцити	2,24
Метамієлоцити	1,87
Кільцевоядерні нейтрофілоцити	1,49
Гігантські нейтрофілоцити	0,37
Сегментоядерні нейтрофілоцити	37,82
Пікнотичні нейтрофілоцити	2,24
Нейтрофілоцити з порушенням грануляції	0,74

Продовження таблиці 2

1	2
Дегенеративні форми нейтрофілоцитів	1,12
Моноцити	4,86
Еозинофіли	2,98
Лімфобласти	1,49
Мієлобласти типові	1,49
Мієлобласти нетипові	0,37
Мієломонабласти	9,73
Плазмобласти	1,87
Плазмоцити	0,74
Мегалобласти (мікрогенерації)	2,24
Нормобласти базофільні	5,99
Нетипові клітини	2,98
Ретикулярні клітини	1,87
Кариорексис	1,12
Анизоцитоз	+
Анизохромія	+
Вакуолізація клітин	+

Наявність мікролімфоцитів, мононуклеарів, що важко диференціюються, лімфоцитів із ядерними конволютами на фоні явної лімфопенії - менше 12%, дозволяє запідозрити імунodefіцит. Зсув уліво клітин гранулоцитарного паростка аж до промієловдгів указує на наявність запального осередку, що підтверджується реєстрацією в ЛВК плазмобластів і клітин плазматичного ряду.

Бластоз вище 5% указує на високу можливість онкогенонебезпечної ситуації. У даному випадку бластоз досягає 20%. Наявність мієломонабластив характерно для злоякісного процесу.

Злоякісний плин процесу документується наявністю нетипових клітин - 2,98%, ретикулярних елементів - 1,87% і кариорексисом.

Таким чином, на пухлинний процес указують (якщо відкинути сумнівні морфологічні критерії) бластоз понад 5% і наявність нетипових клітинних форм, що практично не зустрічаються при доброякісному плинні процесу.

Хвора спрямована до онколога з діагнозом онкогенонебезпечна ситуація, активний процес. Рекомендовано оперативне лікування.

Пациєнтка прооперована на другу добу після госпіталізації. При гістологічному дослідженні віддаленої залози визначена аденокарцинома.

Приклад 2

Хворий К.Е.Ф., 1926 р. народження звернувся до лікаря зі скаргами на болі в області епігастрії. Госпіталізований з діагнозом: рак шлунку, II клінічна група. У периферичній крові ознаки анемії, лімфоцитоз (47%). Прооперований, в антральному відділі шлунка виявлена виразкова форма новоутвору розміром 3,5 * 2,5 см. Гістологічно - ослизлена аденокарцинома. У ранньому післяопераційному періоді відзначена кровотеча в області післяопераційного шва.

При дослідженні лейкограми лейкоконцентрату венозної крові отримані дані за гострий лейкоз у ЛВК проглядалися недиференційовані бластні елементи (30,42%), мієлобласти (6%), лімфобласти (2,02%), мегалобласти (2,23%), ретикуломегабласти (0,2%), а також нетипові (1,21%) і ретикулярні елементи (0,84%).

Таким чином, у хворого виявлена як локальна злоякісна пухлина, так і системне захворювання крові. Сполучення двох нозологічних форм указує на принципову можливість ранньої діагностики онкогенонебезпечних ситуацій за допомогою лейкоконцентрату венозної крові.

Приклад 3

Хвора Б.В.И., 60 років, звернулася до лікаря 31.03.95 із скаргами на болі в області шлунка. Робочий стаж 40 років, останні 8 років займалася рентгеноспектральним аналізом. Лейкограма ЛВК подана в таблиці 3.

Таблиця 3

Лейкограма ЛВК хворий Б.В.И., 60 років

Показники	Відсоток
Мікролімфоцити	3,03
Малі лімфоцити	7,18
Середні лімфоцити	5,5
Лімфоцити з ядерними конволютами	2,2
Лімфоритикулярні клітини	0,82
НК - клітини	1,37
Мієлоцити	0,55
Метамієлоцити	1,65
Паличкоядерні нейтрофілоцити	1,1
Сегментоядерні нейтрофілоцити	38,56
Дегенеративні форми нейтрофілоцитів	1,65
Нейтрофілоцити з гіперсегментованими ядрами	1,65
Нейтрофілоцити з пікнотичними ядрами	2,2
Нейтрофілоцити з утратою межсегментарних зв'язків	1,65
Гігантські нейтрофілоцити	1,1
Моноцити	1,65
Мієломонацити	1,65
Мієломонабласти	1,65
Недиференційовані бласти	4,4
Недиференційовані бласти з ашіастичними ядрами	3,03
Нормобласти оксифільні	1,1
Нормобласти базофільні	1,1
Мегалобласти	1,1
Плазмобласти	0,82
Плазмоцити	0,55
Нетипові клітини	2,75
Малигнізовані клітини	4,4
Ретикулярні клітини	1,1
Вакуолізовані клітини	1,65
Тіні Боткіна - Гумпрехта	3,03
Еозинофіли	0
Базофіли	0
Інші морфологічні знаки: анизоцитоз, анизохромія	+++++
Порушення грануляції нейтрофілоцитів, гіпогрануляція	+++

Дані лейкограми вказують на наявність високого ступеню ризику онкогенонебезпечної ситуації, яка потребує негайного втручання.

Хвора прооперована, видалена пухлина шлунка.

ку, гістологічно -железистий рак

Приклад 4

Хворий С Н Т звернувся 04.06.94 р із приводу збільшення лімфатичних шийних вузлів. Лейкограма ЛВК подана в таблиці 4

Таблиця 4

Лейкограма ЛВК С Н Т

Показники	Відсоток
Малі лімфоцити	7,7
Середні лімфоцити	15,3
Промієлоцити	0,3
Миєлоцити	2,7
Паличкоядерні нейтрофілоцити	1,8
Сегментоядерні нейтрофілоцити	37,1
Гігантські нейтрофілоцити	4,6
Дегенеративні форми нейтрофілоцити	3,3
Мієломонабласти	9,4
Моноцити	9,9
Еозинофіли	1,2
Базофіли	1,8
Плазмобласти в стадії пікноза	1,5
Плазмоцити	0,6
Недиференційовані бласти	1,8
Мегалобласти	0,3
Анізоцитоз	+++
Анізохромія	+
Макроцитоз	++

Висновок: гранулоцитарний зсув вліво аж до промієлоцитів (0,3%), а також наявності мієломонабластів, плазмобластів у стадії пікноза, плазмоцитів, недиференційованих бластів указують на наявність онкогенонебезпечної ситуації - лімфогранулематозу.

При пункції лімфоузла лімфогранулематоз підтверджено.

Приклад 5

Хвора О Л С звернулася до лікаря зі скаргами на дискомфорт в області черевної порожнини зліва. Дані ЛВК подані в таблиці 5.

Таблиця 5

Лейкограма ЛВК хворого О Л С

Номенклатура клітин	Відсотки
1	2
Малі лімфоцити	0,33
Середні лімфоцити	9,0
Мета-мієлоцити	1,34
Паличкоядерні нейтрофілоцити	1,65
Сегментоядерні нейтрофілоцити	50,0
Дегенеративні форми нейтрофілоцитів	6,0
Гіперсегментовані нейтрофілоцити	3,3
Про-моноцити	1,34
Монобласти	0,99
Моноцити	2,64
Еозинофіли	2,31

Продовження таблиці 5

1	2
Базофіли	0,66
Плазмобласти	1,78
Мієлобласти	0,99
Недиференційовані бласти	1,78
Мієломонабласти	1,65
Власна клітина з оксифільною цитоплазмою	0,33
Ретикулярна клітина	1,34
Нетипові клітини	1,78
Малігнізовані клітини	5,33
Клітини з вакуолями	1,78
Клітини накопичення	0,33
Двоядерні нетипові клітини	0,99
Анізохромія	+
Анізоцитоз	+
Поліхроматофільні еритроцити	+++

За даними ЛВК відзначається лімфопенія (9,33%), зацікавленість гранулоцитарного паростка, бластоз понад 5% і виражена малігнізація ЛВК - малігнізовані клітинні елементи визначаються на рівні 5,33%. Злоякісність процесу підтверджується наявністю нетипових клітин (1,78%), тобто важко що диференціюються форми, виявленням клітин із вакуолями, клітин накопичення.

Хвора прооперована в онкологічному відділенні через три доби після надходження. Діагноз: аденокарцинома селезінкового рогу товстого кишечника.

Приклад 6

Хвора П Т Н, 34 року, виявила в груді пухлино-видне утворення розміром із горошину і звернулася до лікаря. Дані ЛВК подані в таблиці 6.

Таблиця 6

Лейкограма ЛВК хворий П Т Н

Показник	Відсотки
Мікролімфоцити	3,67
Малі лімфоцити	10,49
Середні лімфоцити	7,87
Промієлоцити	0,26
Мієлоцити	1,04
Метамієлоцити	0,26
Паличкоядерні нейтрофілоцити	1,04
Сегментоядерні нейтрофілоцити	41,99
Нейтрофілоцити з токсичною зернистістю	0,52
Моноцити	9,18
Еозинофіли	1,57
Базофіли	0
Мієломонацити	2,6
Мієломонабласти	7,34
Недиференційовані бласти	3,13
НК - клітини	1,04
Мононуклеари з аплазією ядра	2,6
Нетипові клітини	1,04
Малігнізовані клітини	4,19

Зроблено висновок об наявності злоякісного

процесу. Таким чином, аналіз ЛВК дозволяє діагностувати початкові стадії онкопроцесу.

Приклад 7

Хворий К В В обстежений із приводу скарг у черевній порожнині. Дані ЛВК подані в таблиці 7.

Таблиця 7

Лейкограма ЛВК хворого К В В

Номенклатура клітин	Відсотки
1	2
Малі лімфоцити	12,65
Середні лімфоцити	18,98
Лімфоретикулярні клітини	0,75
Проміелоцити	1,51
Міелоцити	1,26
Метаміелоцити	8,86
Папичкоядерні нейтрофілоцити	1,01
Сегментоядерні нейтрофілоцити	22,78
Гігантські нейтрофілоцити	0,75
Нейтрофілоцити вакуолізовані	0,75
Нейтрофілоцити що деградують	5,0
Моноцити	0,75
Міеломоноцити	1,51
Мононуклеари з ядерними конволютами	2,53
Плазмоцити	5,0
Недиференційовані бласти	9,62
Міеломонобласти	2,02

Продовження таблиці 7

1	2
Нормобласти	1,51
Ретикулярні клітини	1,51
Кариорексис	1,01
Веретенообразні клітини	1,51
Мононуклеари, що деградують	0,25
Нетипові клітини	2,53
Мегакаріоцити	0,25
Гігантські тромбоцити	0,50
Анізоцитоз	+++
Анізохромія	+++
Еозинофілі	0,75

У лейкограмі ЛВК відзначається зсув вліво аж до проміелоцитів (1,51%) на фоні різко вираженої деградації клітин гранулоцитарного ряду. Виражено бластоз - понад 5% (15%), нетипових елементів - 2,53%. Відзначається зацікавленість тромбоцитарної ланки. Гематологічний діагноз: високий ступінь онкогенонебезпечної ситуації. Хворий помер, на розтині - рак легенів.

Таким чином, знаючи природу шкідливого чинника й оцінюючи стан клітинних елементів ЛВК, можна визначити інтенсивність впливу токсиканта на організм людини, що робить метод необхідним інструментом для досліджень в області антропобіоіндикації і клінічної екології.

Запропонований спосіб достатньо простий і точність діагностики злоякісної пухлини складає 96%.